



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Identificación de sustancias migrantes derivadas del envasado y cocinado de alimentos en bolsas de silicona

Migrant compounds identification from the silicone bags used as packaging or cooking of food

Autor/es

Grecia Isabel Alfonzo García

Director/es

Celia Domeño Recalde

Paula Vera Estacho

Facultad de Veterinaria

2021

INDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. ENVASE ALIMENTARIO.....	3
2.1.1. <i>Polímeros. La silicona</i>	4
2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS DE ENVASES ALIMENTARIOS	6
2.3. LEGISLACIÓN EUROPEA VIGENTE	9
2.4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN ENVASE-ALIMENTO	10
2.5. ANÁLISIS DE RIESGO DE LOS COMPUESTOS MIGRANTES	11
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO GENERAL	13
4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO	14
4.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES	14
4.2. INSTRUMENTACIÓN	15
4.3. MUESTRAS ANALIZADAS	16
4.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	17
4.4.1. <i>Screening de compuestos de la silicona</i>	17
4.4.2. <i>Ensayos de migración envase-simulante</i>	17
4.4.2.1. <i>Protocolo extracción de compuestos migrantes en Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o Tenax®</i>	18
4.4.2.2. <i>Protocolo extracción de compuestos migrantes en Ácido Acético 3%</i>	20
4.4.2.3. <i>Cuantificación de los compuestos migrantes</i>	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
5.1. COMPUESTOS PRESENTES EN EL ENVASADO DE SILICONA	21
5.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MIGRANTES DE LA SILICONA.	28

5.2.1. <i>Identificación y cuantificación de compuestos migrantes hacia el Simulante E.</i>	28
5.2.2. <i>Identificación y cuantificación de compuestos migrantes en el Simulante B.</i>	33
5.3. ANALISIS DE RIESGO	34
6. CONCLUSIONES	36
CONCLUSIONS	36
7. VALORACIÓN DE LA ASIGNATURA	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38

1. RESUMEN

Hoy en día los envases además de cumplir la función básica de contener al alimento, deben de proteger y conservar su calidad e integridad. Pueden convertirse en un serio problema si no se controlan algunos aspectos del envase como, por ejemplo, la transferencia de materia a través de este, conocida como la migración. Este factor tiene una gran importancia tanto para las empresas productoras de dichos materiales como para el consumidor, ya que todos los materiales para envase alimentario deben de ser seguros para la salud y no deberían de migrar compuestos del material al alimento.

Por tanto, para el desarrollo o producción de nuevos envases se requiere evaluaciones de seguridad que siempre implican la aplicación de métodos analíticos complejos, para asegurar que dichos materiales son seguros y no perjudiciales para la salud del consumidor. En el presente trabajo se realizó un estudio de unas bolsas de silicona de uso alimentario de la marca comercial “Stasher”, muy utilizadas en Estados Unidos tanto para conservar diferentes tipos de alimentos como para la cocción en microondas de estos.

Inicialmente se determinaron los compuestos volátiles presentes en dichos materiales y posibles migrantes al alimento. Para ello, se llevó un análisis cualitativo o screening directamente del envase de silicona mediante la técnica HS-SPME-GC-MS (microextracción en fase sólida por espacio de cabeza acoplada a cromatografía gases con espectrometría de masas).

Posteriormente se realizaron ensayos de migración para determinar los compuestos volátiles que realmente migraban al alimento. Se utilizaron dos simulantes alimentarios, poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o Tenax® y ácido acético 3% estipulados en el Reglamento (CE) n° 10/2011 (Unión Europea, 2011) con diferentes condiciones de ensayo, también recogidas en dicha legislación. El ensayo de migración en Tenax® consistió en someter láminas del envasado a 175 °C durante 2 horas y 40 °C durante 10 días y el extracto se analizó por inyección directa en GC-MS. Para el simulante ácido acético 3% se realizaron ensayos durante 6 horas a 60 °C y 40 °C durante 10 días y se analizó por espacio de cabeza de la técnica SPME-GC-MS.

Los resultados obtenidos al realizar el screening de las muestras sugieren una lista de posibles migrantes químicos a los alimentos muy amplia, destacando la identificación de

oligómeros ciclados de silicona que generan cromatogramas característicos con picos de metilciclosiloxanos equidistantes. También se encontraron algunos productos de degradación como 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone y 2,7-dimethylnaphthalene, 1,3-diisopropylnaphthalene o 1,7-diisopropylnaphthalene, los cuales son compuestos disruptores endocrinos.

Tras la realización de este trabajo se concluye que los oligómeros de silicona migrados al Tenax[®] superan el límite de 0,09 mg/Kg según las Reglas Cramer. Por tanto, dicho material no se podía utilizar para alimentos secos ni para almacenamiento ni para cocción. Sin embargo, para el simulante ácido acético 3%, dichos compuestos estaban por debajo de su límite de detección que era 0,5 ng/g y por tanto muy por debajo del valor recomendado por Cramer. Así dicho material era permitido su uso para alimentos ácido con pH < 4,5.

ABSTRACT

Today's packaging not only fulfils the basic function of containing food, but also has to protect and preserve its quality and integrity. They can become a serious problem if certain aspects of the packaging are not controlled, such as the transfer of substances through the packaging, known as migration. This factor is of great importance for both the companies producing such materials and the consumer, as all food packaging materials must be safe for health and no compounds should migrate from the material into the food.

Therefore, the development or production of new packaging requires safety assessments, which always involve the application of complex analytical methods, to ensure that these materials are safe and not harmful to the health of the consumer. In the present work, a study was carried out on food grade silicone bags of the commercial brand "Stasher", widely used in the United States both for preserving different types of food and for microwave cooking.

Initially, the volatile compounds present in these materials and possible migrants to food were determined. For this purpose, a qualitative analysis or screening was carried out directly from the silicone packaging using the HS-SPME-GC-MS technique (headspace solid phase microextraction) coupled to gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS).

Subsequently, migration assays were performed to determine which volatile compounds actually migrated into the food. Two food simulants were used, poly (2,6-diphenyl-p-phenylene

oxide) or Tenax® and 3% acetic acid as stipulated in Regulation (EC) N° 10/2011 (European Union, 2011) with different test conditions, also stipulated in this legislation. The migration test on Tenax® consisted of subjecting films from the packaging to 175 °C for 2 hours and 40 °C for 10 days and the extract was analysed by direct injection in GC-MS. For the 3% acetic acid simulant, it was carried out for 6 hours at 60 °C and 40 °C for 10 days and analysed by headspace SPME-GC-MS technique.

The results obtained from the screening of the samples suggest a very broad list of possible chemical migrants to food, highlighting the identification of cyclised silicone oligomers that generate characteristic chromatograms with equidistant methylcyclsiloxane peaks. Some degradation products such as 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone and 2,7-dimethylnaphthalene, 1,3-diisopropylnaphthalene or 1,7-diisopropylnaphthalene, which are endocrine disrupting compounds, were also found.

The conclusion of this work is that the silicone oligomers migrated into Tenax® exceed the limit of 0,09 mg/Kg according to the Cramer Rules. Therefore, this material could not be used for dry food either for storage or cooking. However, for the 3% acetic acid simulant, these compounds were below the detection limit of 0,5 ng/g and therefore well below the Cramer recommended value. Thus, this material was allowed to be used for acidic foods with a pH < 4.5.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ENVASE ALIMENTARIO

En la actualidad los envases resultan esenciales para la industria alimentaria ya que estos prolongan la vida útil de los alimentos, protegiéndolos del medio externo, garantizando su seguridad, fácil manipulación y transporte. La naturaleza de los materiales que se pueden utilizar para el envase alimentario es muy diversa: naturales, mínimamente procesados, totalmente sintéticos, etc. Entre estos se encuentran una amplia variedad de materiales plásticos, vidrios, corchos, cauchos, papeles, cartones, cerámicas, metales, madera, productos textiles, ceras o siliconas. (Alamri M. et al., 2021).

A pesar de que el envasado de alimentos tiene un gran impacto negativo en el medio ambiente por la acumulación de residuos no biodegradables en vertederos, ríos, océanos..., es esencial en nuestras vidas, con multitud de aplicaciones y ventajas para el alimento; evitando la acción de agentes físicos, químicos y microbiológicos que pueden llegar a alterar las características organolépticas, nutritivas y/o sanitarias, y como consecuencia la pérdida de una gran cantidad de productos a nivel mundial (Brennan L. et al., 2021).

De la misma manera, el envasado de alimentos ha ido evolucionado a lo largo del tiempo, como por ejemplo con el desarrollo de materiales biodegradables, con la búsqueda de técnicas más funcionales, dando la opción a que el mismo envase sirva para la cocción de alimentos. Así mismo, se plantea el uso de envases reutilizables, lo cual minimiza costes y daños ambientales por contaminación.

2.1.1. Polímeros. La silicona

Los plásticos son polímeros orgánicos de alto peso molecular obtenidos por la unión de una o más moléculas pequeñas repetidas a lo largo de una cadena. La unidad que se repite en el polímero es el monómero y la reacción por la que se forman, es la reacción de polimerización. El plástico es un material inmensamente versátil, ideal para una amplia gama de aplicaciones industriales y de consumo. Los Polímeros más comunes empleados en la industria alimentaria son el polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliestireno expandido (EPS), polietileno (PET), polietileno de baja densidad (LDPE) y el tereftalato de polietileno de alta densidad (HDPE) (Aysel İ. et al., 2016).

Dentro de los polímeros nos encontramos con otro grupo que son las siliconas, que son un grupo de polímeros formados por el monómero $-(\text{SiR}_2\text{-O})_n-$, donde "R" es un grupo metilo, y n es las unidades que se repiten del monómero formando los oligómeros, véase Figura 1.

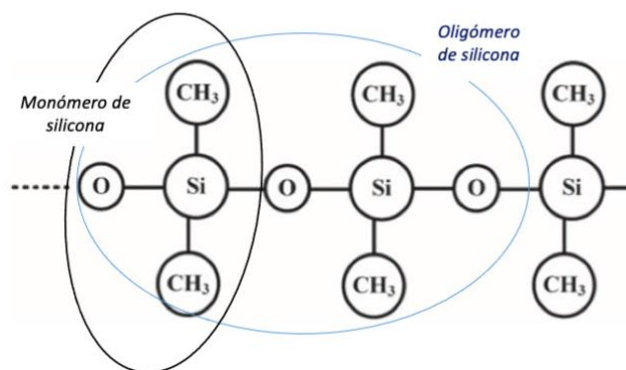


Figura 1: Estructura química de la unión de monómeros de silicona lineal.

Se denominan también polidimetilsiloxanos y abreviados como PDMS. La cadena de átomos de silicio y oxígeno en su estructura, hacen que tenga gran estabilidad química (Gutiérrez M. et al., 2009). Con características únicas, como la resistencia y estabilidad a un amplio rango de temperaturas. También propiedades no oxidantes, resistencia a altas presiones y su gran flexibilidad (Akbar M. et al., 2019). Gracias a estas propiedades se han encontrado un amplio rango de aplicaciones como el envasado de alimentos para su almacenamiento e incluso su cocinado.

La Figura 1 corresponde a la estructura de polímeros lineales (L) de silicona, sin embargo, se pueden encontrar cadenas cíclicas de silicona (D), véase la Figura 2 (Tran V. et al., 2019):

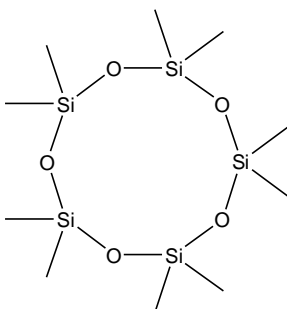


Figura 2: Estructura química de la unión de monómeros de silicona ciclada.

Los oligómeros cíclicos se forman al someter las cadenas de PDMS a calentamiento lento, favoreciendo la división molecular de los oligómeros de la cadena debido a su flexibilidad y la existencia de los orbitales de silicio vacíos (Camino G. et al., 2002). Las reacciones de intercambio

de enlaces de siloxano producen mezclas de oligómeros cíclicos, productos poliméricos que tienen pesos moleculares considerablemente más altos (Bannister D. et al., 1981).

2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS DE ENVASES ALIMENTARIOS

El análisis de envases alimentarios requiere una identificación y cuantificación en muestras complejas, por lo que las técnicas analíticas tienen que ser sensibles, robustas y específicas para la detección de compuestos que se pueden encontrar a bajas concentraciones. Dentro de las técnicas instrumentales comúnmente empleadas está la cromatografía. Puede ser de gases o líquida, su elección dependerá de los compuestos que se quiera determinar. En el caso de compuestos volátiles o semi-volátiles la técnica seleccionada será cromatografía de gases (GC), en el caso de compuestos no volátiles se determinarán mediante cromatografía líquida (LC) (González J., 2010).

En dicho estudio, la separación se llevará a cabo mediante cromatografía de gases para la determinación de compuestos volátiles y semivolátiles como posibles migrantes en las muestras de silicona. Esta técnica consiste en grandes rasgos en la separación de los compuestos según la interacción de estos con la fase estacionaria, que es una columna cromatográfica. La muestra es arrastrada por un flujo de gas helio, que conforma la fase móvil. Los compuestos interaccionan con la fase estacionaria al incrementar la temperatura produciendo la distinta retención de los compuestos. Seguidamente, los compuestos separados en la columna pasan a un detector que emite una señal proporcional a la concentración de estos.

Para este trabajo, el detector acoplado al equipo es un espectrómetro de masas (MS). Se fundamenta en la ionización de las moléculas que procesa, fragmentándolas en masas menores con las que, posteriormente, genera la señal correspondiente a una proporción entre masa molecular y carga de estas partículas.

En cromatografía de gases se puede trabajar principalmente con tres tipos distintos de inyección en función del disolvente a emplear:

- Inyección directa: Se basa en introducir una determinada cantidad de muestra líquida mediante una jeringa directamente al inyector. La muestra es vaporizada completamente

antes de entrar a la columna cromatográfica. Es la más sencilla, ya que se evita la optimización de factores puesto que la muestra es introducida en la columna en su totalidad, sirve para un amplio rango de concentraciones y trabaja con disolventes orgánicos.

- “Head Space” (HS): La muestra se calienta para favorecer que los compuestos volátiles pasen al espacio de cabeza de un vial sellado herméticamente. La temperatura y el tiempo que se aplican para el paso de compuestos al espacio de cabeza son variables a optimizar, y deberían permitir que las fases de los compuestos alcancen un equilibrio. Una vez alcanzado se analiza una alícuota de la atmosfera que se ha formado.
- Solid Phase Micro Extraction (SPME): Se utiliza una fibra de microextracción en fase solida (SPME) capaz de absorber o adsorber compuestos en su matriz, para posteriormente desorberlos en la columna para su separación cromatográfica. Permite trabajar con sólidos y con muestras acuosas ya que la muestra no se introduce directamente en la columna, sólo los compuestos previamente retenidos en la fibra. Como en el caso anterior la temperatura y el tiempo de extracción también deben de ser optimizados.

El método SPME es un método de extracción moderno y sensible ya que en el se utiliza una fibra de sílice fundida revestida con una fase polimérica. Esta técnica puede trabajar de dos maneras: extrayendo compuestos volatilizados previamente en el espacio de cabeza “HEADSPACE” o por inmersión de esta en la muestra, concentrando así los compuestos y ganando sensibilidad en el análisis. En ambos casos la fibra los resorbe en su matriz y los desorbe en la columna cromatográfica para su separación. A diferencia de la inyección directa, ofrece la opción de inyectar muestras con agua, pero no disolventes orgánicos que superen el 20% de concentración. Al emplear SPME se optimizan parámetros como:

- **La fibra a emplear:** existen en el mercado numerosos tipos de fibras que se diferencian en el grosor y la polaridad de sus fases estacionarias, se elige una fibra de SPME que permita obtener la mejor señal ya que existen de distintos materiales específicos dependiendo de los compuestos a determinar.

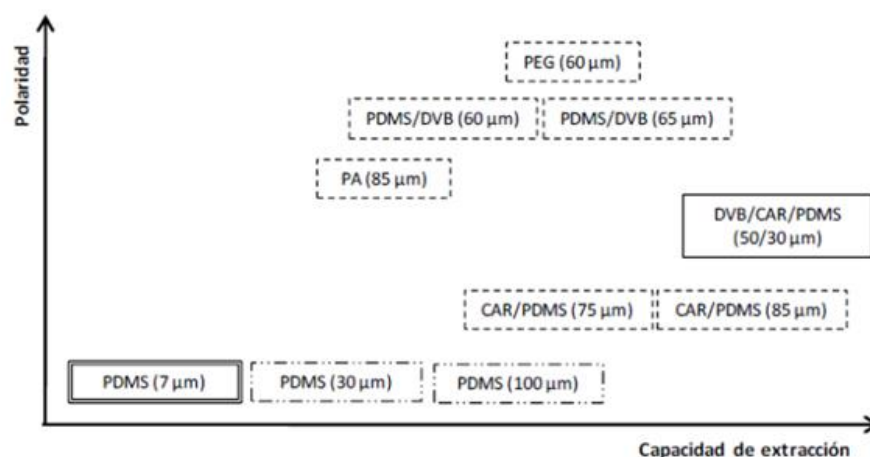


Figura 3: Propiedades de las fibras de SPME comerciales.

- **Tiempo y temperatura:** Las muestras se someten a tratamiento previo favoreciendo así la extracción de los compuestos retenidos en esta.

Por otro lado, en cromatografía de gases existen columnas de distinto diámetro y longitud así como de distinta naturaleza, pueden ser polares, semi-polares o apolares. La columna cromatográfica está conectada a un portal de inyección con temperatura controlada, de forma que la muestra se inyecta a una temperatura suficiente para asegurar la vaporización de todos los componentes.

Por lo común, como se ha comentado anteriormente, el helio es el gas portador empleado para GC para arrastrar los compuestos. Así mismo, la manera en la que la muestra se introduce en la columna puede realizarse siguiendo técnicas distintas: La inyección en “Split” consiste en que la muestra es vaporizada completamente pero solo una pequeña porción se introduce en la columna, el resto se descarta, y la inyección en “Splitless” en cambio, se basa en la vaporización e inyección de la muestra en su totalidad en la columna. Posteriormente, los compuestos se separan debido a la interacción por diferente adsorción entre los componentes de la corriente de gas y la fase estacionaria, así como por diferencia en el punto de evaporación. Al introducir la muestra en la columna el horno se programa para que varíe en el rango de temperaturas optimizado previamente para conseguir la mejor separación de los compuestos.

Al final de la columna, el detector de masas somete a los compuestos a un impacto electrónico, aplicando 70eV. Los primeros en volatilizarse serán los primeros en detectarse pues serán los primeros en salir de la columna. El detector de masas trabaja siguiendo dos métodos distintos de detección: el método SCAN o barrido y el método SIM (Selected Ion Monitoring por sus siglas en inglés). El método SCAN se emplea con la finalidad de analizar todos los iones en un rango de masas de 50 a 400 mz. A diferencia del método SCAN, el método SIM se basa en seleccionar en el detector masas moleculares específicas.

Cuando se parte de una muestra desconocida la opción inicial es utilizar el método SCAN para hacer un screening o análisis cualitativo de la muestra, una vez caracterizada se puede seleccionar los analitos objetos de estudio y trabajar con SIM especificando las masas de los compuestos seleccionados. De esta forma, el detector de masas se convierte en un detector cromatográfico selectivo registrando un compuesto de interés en una mezcla compleja y cuantificando con mayor sensibilidad.

Los espectros generados una vez introducidas las muestras se visualizan mediante software de análisis de datos como el MSD ChemStation y la identificación de compuestos se lleva acabo haciendo uso de librerías de espectros como la NIST (National Institute for Standards and Testing). Las librerías son posibles ya que el detector de masas aplica siempre el mismo voltaje, generando espectros de masas característicos para cada molécula, por tanto, esto permite la identificación de los compuestos separados. Los cromatogramas son diagramas que representan los resultados de la separación de una muestra, en donde en el eje de las ordenadas se representa el valor de la abundancia, mientras que en el de las abscisas el tiempo de retención de cada uno de los compuestos detectados.

2.3. LEGISLACIÓN EUROPEA VIGENTE

En la Unión Europea, los materiales plásticos que se comercializan deben de ser conformes con su normativa específica la cual es el Reglamento (CE) n° 10/2011 (Unión Europea, 2011). En cuanto a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con los alimentos, el Reglamento marco (CE) n° 1935/2004 recoge los requisitos generales a cumplir (Parlamento Europeo y Consejo, 2004). Asimismo, las buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a

entrar en contacto con alimentos se describen en el Reglamento (CE) n° 2023/2006 (Unión Europea, 2006).

La legislación 10/2011/EU abarca importantes puntos clave sobre los materiales plásticos, enumera las sustancias que pueden utilizarse intencionadamente en la fabricación de materiales y objetos plásticos, así como los límites de migración de estos compuestos. También las condiciones de los ensayos de migración tanto los simulantes alimentarios recomendados y las condiciones de ensayo; tiempo y temperatura.

El Reglamento (CE) n°10/2011 dicta que la migración se puede expresar como cantidad de sustancia migrada por kilogramo de alimento (mg/kg) y establece el límite de migración global (LMG) y los límites de migración específica (SML).

- **Límite de migración global:** cantidad máxima permitida como suma total de sustancias liberadas desde el material objeto de estudio al simulante alimentario. Este límite no debe de superar 60 mg/Kg, como total de todas las sustancias.
- **Límite de migración específica:** cantidad máxima permitida de una sustancia individual liberada desde el material hacia el simulante alimentario. Este valor depende de cada sustancia. Para aquellas sustancias que puedan suponer problemas o riesgos, se establecen límites mucho más estrictos, en función de su toxicidad potencial, para garantizar así la seguridad del material u objeto final.

2.4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN ENVASE-ALIMENTO

La migración es un proceso de transferencia de masa que se produce debido a la capacidad de todos los sistemas químicos a alcanzar el equilibrio. Debido a esta tendencia, las sustancias químicas tienden a transferirse de los envases a los alimentos (Wrona M, Nerín C., 2020). Para realizar los ensayos de migración, debido a la naturaleza heterogénea de los alimentos, la determinación de compuestos migrantes en estos directamente, puede presentar grandes dificultades analíticas. Para evitar esto, se sustituyen los alimentos por soluciones simulantes que tratan de imitar la acción extractiva de los mismos.

Según el Reglamento (CE) n° 10/2011: “Un simulante alimentario es un medio de ensayo que imita un alimento, en su comportamiento. El simulante alimentario imita la migración a partir de materiales en contacto con los alimentos”

Existen diferentes tipos de simulantes, dependiendo del alimento que vaya a estar en contacto con el envase.

Simulante alimentario	Abreviatura						
Etanol 10 % (v/v)	Simulante alimentario A						
Ácido acético 3 % (w/v)	Simulante alimentario B						
Etanol 20 % (v/v)	Simulante alimentario C						
Etanol 50 % (v/v)	Simulante alimentario D1						
Aceite vegetal (*)	Simulante alimentario D2						
poli(óxido de 2,6-difenil- <i>p</i> -fenileno), tamaño de partícula 60-80 malla, tamaño de poro 200 nm	Simulante alimentario E						
(*) Puede tratarse de cualquier aceite vegetal con esta distribución de ácidos grasos:							
Nº de átomos de carbono en la cadena de ácidos grasos: nº de insaturación	6-12	14	16	18:0	18:1	18:2	18:3
Gama de composición de los ácidos grasos expresada en % (w/w) de ésteres metílicos por cromatografía de gases	< 1	< 1	1,5-20	< 7	15-85	5-70	< 1,5

Figura 4: Simulantes alimentarios establecidos en el Reglamento (CE) n° 10/2011.

Una vez seleccionado el simulante, se escogerán las condiciones de ensayo, temperatura y tiempo en función de las condiciones de almacenamiento o utilidad de los alimentos en el envase. Estas condiciones también se recogen en dicha legislación.

2.5. ANÁLISIS DE RIESGO DE LOS COMPUESTOS MIGRANTES

Para el estudio de toxicidad de los compuestos que migran, los valores de migración se comparan con los límites de migración específica (LME) de la lista positiva de la legislación 10/2011/EU. Si los compuestos no aparecen en dicha lista, su toxicidad se evalúa a partir de las Reglas de Cramer. Estas reglas clasifican los compuestos en tres niveles de toxicidad teóricos, dependiendo de la estructura molecular y proponen su máxima ingesta diaria de mg/Kg siendo:

- 1,8 para los compuestos de grado de toxicidad I.
- 0,54 para los compuestos de grado de toxicidad II.

- 0,09 para los compuestos de grado de toxicidad III

Para clasificar los compuestos se utiliza el software Toxtree v1.51 (Ideacon Ltd.). El cual utiliza un árbol de decisión en el que formula diferentes preguntas acerca de su estructura química. En función de la respuesta (SI o NO) el compuesto es directamente clasificado en uno de los grupos de toxicidad o es necesario responder a otra pregunta adicional. La Figura 5 muestra un ejemplo de árbol de decisión para un compuesto.

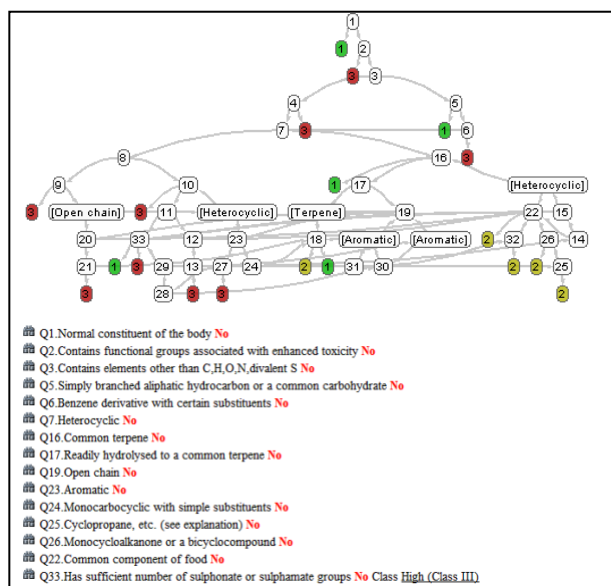


Figura 5: Árbol de decisión utilizado por el programa Toxtree para la clasificación de un compuesto

Cada círculo representa una pregunta, según la respuesta a ella, el compuesto sigue una ruta diferente. Si el círculo tiene color verde es que se ha clasificado directamente en la Clase I, si es amarillo como clase II y si es rojo como Clase III. Por ejemplo, la Pregunta 1 es si la sustancia es un constituyente normal del cuerpo, si la respuesta es SI: el compuesto es directamente clasificado de Clase I, si la respuesta es NO: pasar a la siguiente pregunta 2 que pregunta si tiene grupos funcionales que aumenten la toxicidad, si la respuesta es SI: compuesto clasificado clase III y si es NO: pasar a la pregunta 3 y así sucesivamente. Tras la evaluación con el árbol de decisión, nos muestra la clasificación del compuesto que se busca, según su toxicidad, véase en la Figura 6, el ejemplo del compuesto reteno.

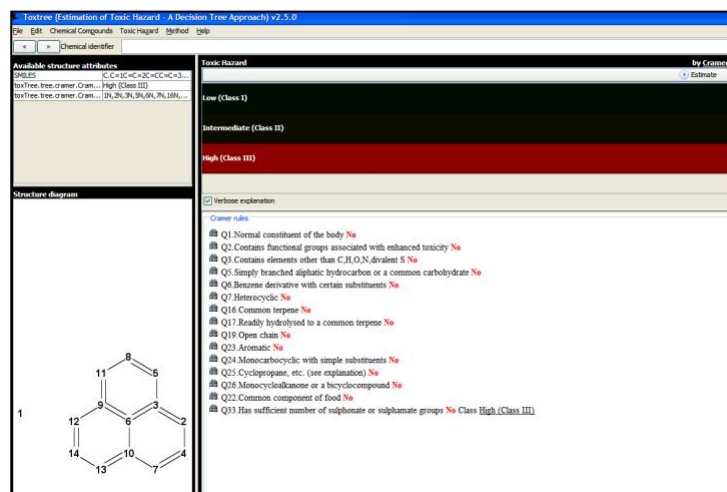


Figura 6: Resultado de la clasificación del compuesto reteno en el programa Toxtree.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO GENERAL

El objetivo fundamental de este estudio es la identificación de sustancias potencialmente migrantes derivadas del envasado y cocinado de alimentos en bolsas de silicona comerciales.

La interacción de los alimentos con el envase alimentario es muy importante, ya que la mayoría de los materiales pueden transferir sustancias a los alimentos envasados. Esto hace que sean necesarios más conocimientos sobre el riesgo que implican estos compuestos potencialmente migrantes al entrar en contacto con el alimento mediante los estudios de migración.

Para alcanzar el objetivo general, se fijan los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y análisis cualitativo de los principales compuestos volátiles presentes en el envase de silicona.
- Ensayos de migración con dos simulantes diferentes, simulante B (acético al 3%) y simulante E (tenax), en las condiciones recomendadas por la legislación para comprobar la migración.
- Identificación de los principales compuestos migrantes del envasado de silicona hacia el simulante alimentario B: Ácido Acético 3%.

- d) Identificación de los principales compuestos migrantes del envasado de silicona hacia el simulante alimentario E: Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o Tenax[®].
- e) Cuantificación de los oligómeros de silicona migrados del envasado hacia el simulante alimentario.
- f) Estudio de las características analíticas del método: rango de respuesta lineal, límite de detección y reproducibilidad.
- g) Evaluación del riesgo de los compuestos migrantes. Contrastar los resultados obtenidos y determinar si son conformes a los límites establecidos en la legislación europea vigente
- h) Evaluación de los resultados obtenidos en la investigación.

4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

4.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Agua ultra pura Millie Q[®]
- Etanol 100% grado HPLC suministrado por Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España)
- Decametilciclopentasiloxano:

El decametilciclopentasiloxano suministrado por Sigma Aldrich química S.A. (Madrid, España), abreviado como “D5”, se utilizó para la cuantificación de oligómeros de silicona migrados a los simulantes alimentarios.

- Simulantes alimentarios:

El Reglamento (CE) n° 10/2011 hace referencia a 6 tipos de simulantes para realizar ensayos de migración global de materiales plásticos, sin embargo, los métodos de ensayos desarrollados en este estudio para la migración del envase de silicona se limitan a dos;

- **Ácido acético 3% (m/m):** Se designa como “simulante B”, se asigna a alimentos que tengan carácter hidrofílico, capaces de extraer sustancias hidrofílicas. El simulante B se emplea

para alimentos que tengan un pH inferior a 4,5 como por ejemplo vinagre, salsas, leches fermentadas o frutas y hortalizas en puré.

- **Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o Tenax ®:** Se designa como “simulante E” y se destina a ensayar la migración específica en alimentos secos como por ejemplo frutos secos, cereales, harinas, pastas secas, azúcar, quesos etc. El Tenax ® fue suministrado por Sigma Aldrich química S.A. (Madrid, España).

4.2. INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación con la que se ha desarrollado el trabajo es la siguiente:

- CTC Analytics CombiPal de Agilent (Palo Alto, CA, US) con inyector automático acoplado a un cromatógrafo de gases 6890 N Agilent, equipado con un espectrómetro de masas 5975 B Agilent y una columna capilar “DB-5” de naturaleza semipolar con las siguientes dimensiones: 30m x 0,25mm x 0,25µm.
- Espectrofotómetro, detector de masas en método SCAN: El espectrofotómetro se emplea eligiendo el método SCAN mencionado anteriormente, donde se detectan todas las masas comprendidas entre 50 a 400 mz.
- Software de análisis de datos MSD ChemStation: Programa acoplado al CTC Analytics donde se generan los datos que, además emplea la librería NIST (National Institute for Standards and Testing), librería donde se encuentran guardados todos los datos recopilados por el espectrofotómetro y que hace posible la identificación de compuestos.
- Fibra de microextracción en fase sólida (SPME): Para el estudio de migración por SPME se eligió la fibra DVB/CAR/PMDS (Divinilbenceno/Carboxen/ polydimethylsiloxano) de 50/30µm de espesor. Suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). Esta fibra es semipolar y con alta capacidad de extracción. Es una fibra útil para extraer compuestos de diferentes polaridades en el envase.
- Balanza analítica de precisión Mettler TOLEDO XS105DU Dual Range.
- Centrifuga P selecta Centromix modelo S-549.
- Centrifuga Beckman Coulter, modelo microfuge 18 centrifuge.
- Soxhlet P selecta.
- Evaporador Sample Concentrator Techne.

- Ultrasonidos. BRANSON 3510.

4.3. MUESTRAS ANALIZADAS

En este estudio se analizaron bolsas de silicona de la marca comercial “Stasher” con cierre hermético de uso alimentario. Se comercializan principalmente en Estados Unidos debido a sus múltiples usos prácticos; como el almacenamiento tanto en refrigeración como en caliente, y cocinado en microondas u horno. Además, este tipo de productos compiten en el mercado como consecuencia de la amplia búsqueda de alternativas que favorezcan la reducción de uso de plásticos, al poder ser reutilizados lo que supone una mejora en el medio ambiente.

En la Figura 7 se muestra una foto de las muestras estudiadas, tienen dos caras una transparente y la otra opaca y se tomaron como:

O: OPACA (A, B, C)

T: TRANSPARENTE (A, B, C)



Figura 7: Bolsas de silicona de uso alimentario objetivo de estudio.

4.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.4.1. Screening de compuestos de la silicona

Al realizar un “screening” se lleva a cabo un análisis cualitativo de la composición de las muestras. Es el paso previo ante una muestra desconocida para conocer en parte su composición, por tanto, es el primer análisis ejecutado. El análisis se efectuó por triplicado recortando trozos de silicona de aproximadamente 1 cm², tanto de la superficie opaca como de la transparente. Las muestras se colocan en viales de vidrio de 20 mL cubiertas con agua ultra pura Millie Q[®] para el análisis mediante HS-SPME-GC-MS.

Para el análisis screening de las muestras a través del método de inyección por HS -SPME, tal y como se explica en el apartado 2.2, se deben optimizar los parámetros de tiempo/temperatura y la elección de la fibra a emplear. En este estudio se trabajó con las mismas condiciones de estudios previos, con la fibra DVB/CAR/PMDS calentado las muestras a 80 °C y extrayendo los compuestos durante 30 minutos. Estos parámetros permiten obtener una buena extracción de compuestos al espacio de cabeza sin llegar a someter las muestras a tratamientos agresivos (Wrona M., 2020).

Tras la extracción con la fibra SPME, se inyecta el extracto a una temperatura de 250 °C en modo Splitless de 1 minuto y el horno se programa a 50 °C durante 2 min, con una velocidad de 10 °C/ min hasta 300 °C y un flujo de helio de 1 mL / min.

4.4.2. Ensayos de migración envase-simulante

La metodología empleada para la realización de los ensayos de migración consiste en el uso de dos simulantes alimentarios. En este trabajo se ha elegido el simulante B y el simulante E, gestionados por la legislación 10/2011/EU y explicados en el apartado 4.1. Las muestras se tomaron de dos secciones distintas (cara opaca y la cara transparente) de las bolsas comerciales de silicona y por triplicado.

Para ambos ensayos, se estipulan dos parámetros de temperatura y tiempo, simulando las peores condiciones previsibles de uso del material, descritas a continuación. Una vez sometidas las

muestras a estas condiciones se analizan mediante cromatografía de gases con detector de masas acoplado por espectrofotometría de masas (GC-MS) en método SCAN.

4.4.2.1. Protocolo extracción de compuestos migrantes en Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o Tenax®

Para el estudio de migración a Tenax[®] (simulante E) es necesario llevar a cabo inicialmente una etapa de limpieza de dicho simulante, tal y como se describe en la norma UNE-EN 14338. Para ello se limpió previamente en un Soxhlet con acetona durante 6 horas como describe dicha norma y posteriormente se secó durante 2 horas a 100 °C (UNE-EN, 2004).

Las muestras se ensayaron por triplicado, recortando la silicona en laminados de 4 x 2 cm² y se diferenciaron según la zona del envase tomada (la parte opaca o la transparente). Se cubrieron formando una capa uniforme con 0,32 gramos de simulante E, siguiendo la norma UNE-EN 14338 que dicta 4 g_{Tenax}/dm². A continuación, se colocaron en el interior de una placa Petri y seguidamente se colocaron en el horno. Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos de migración se realizaron sobre dos parámetros de tiempo/temperatura:

- **40 °C durante 10 días:** simulando un largo almacenamiento del alimento.
- **175°C durante 2 horas:** simulando una cocción intensa.

Una vez transcurrido los distintos tiempos a las respectivas temperaturas se retiró el trozo de silicona para detener la migración, para la posterior extracción del Tenax[®]. Los 0,32 gramos de simulante se extrajeron con 3,4 mL de etanol puro. Esta extracción se realizó mediante ultrasonidos, colocando las muestras con etanol por un tiempo de 30 minutos, logrando la separación de los dos extractos. El proceso se repitió tres veces consecutivas para conseguir el máximo rendimiento de la extracción. Para una mayor separación de los extractos se utilizó una centrifugación final a 3000 rpm durante 20 minutos.



Figura 8: Extracción en las muestras por ultrasonidos (izquierda) separación del Tenax[®] del etanol por centrifugación (derecha).

El extracto obtenido se concentró aproximadamente hasta 3 mL en placa calefactora mediante una corriente de N₂ y una temperatura de 45 °C, en viales de vidrio de 20 mL previamente pesados y referenciados, véase Figura 9.



Figura 9: Muestras una vez concentradas hasta aproximadamente 3mL.

Una vez concentradas las muestras se pesaron nuevamente, de esta manera se podría determinar los gramos finales de muestra analizados. El concentrado se centrifugó nuevamente antes de ser inyectados, ya que cualquier resto de Tenax[®] perjudicaría la integridad de la columna.

A continuación, las muestras concentradas y centrifugadas se trasvasaron a viales de vidrio de 2 mL, véase Figura 10, para ser analizadas mediante inyección directa y GC-MS. Ya que la extracción de compuestos migrados de las muestras de silicona al simulante E se realiza tratando con un disolvente orgánico puro (etanol), por lo que el uso del método SPME es incompatible. El horno se programó de manera que mantuviera una temperatura de 50 °C durante 2 min, con una velocidad de 10 °C / min hasta 300 °C con un flujo de helio de 1 mL / min. El volumen inyectado es de 1 µL, la temperatura del inyector se programó a 250 °C en modo Splitless de 1 minuto.

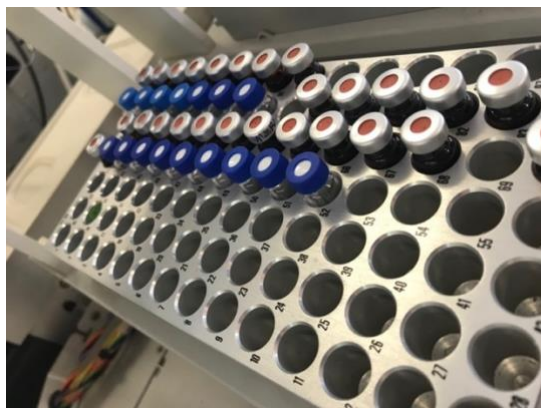


Figura 10: Muestras colocadas para ser estudiadas por Inyección directa GC-MS.

4.4.2.2. Protocolo extracción de compuestos migrantes en Ácido Acético 3%.

Siguiendo el Reglamento (CE) n° 10/2011 descrito anteriormente, se emplea Ácido Acético 3% como simulante alimentario (Simulante B). Para preparar dicho simulante se añadieron 6 mL de HAC en 194 mL de agua ultra pura Millie Q ®.

Para llevar a cabo el ensayo de migración, las muestras se cortaron en trozos de 5 x 1 cm² de superficie y se colocaron en viales de vidrio de 20 mL, referenciándolas según la zona de la bolsa de silicona tomada y por triplicado. Se añadieron a cada vial 18 mL de la disolución del simulante B siguiendo el Reglamento (CE) n° 10/2011 que dicta 6 dm² por Kg de simulante. Estos viales se colocaron en el horno para realizar los ensayos de migración, sometiéndolas a dos parámetros de tiempo/temperatura:

- **40 °C durante 10 días:** simulando un largo almacenamiento del alimento.

- Una vez sometidas las muestras a estas condiciones, se retiraron los trozos de silicona para detener la migración y fueron analizadas por HS-SPME-GC-MS, véase Figura 11. Se emplea la inyección por HS-SPME, ya que la concentración del ácido acético lo permite, además este método tiene mayor sensibilidad ya que implica una preconcentración. Siguiendo el procedimiento, las muestras se someten previamente a un tratamiento durante 30 minutos a 80°C sobre la placa donde se posicionan. Una vez precalentadas se inyectan a una temperatura de 250 °C en modo Splitless de 1 minuto y el horno se programa para estar 50 °C durante 2 min, con una velocidad de 10 °C / min hasta 300 °C con un flujo de helio de 1mL / min.



4.4.2.3. Cuantificación de los compuestos migrantes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. COMPUESTOS PRESENTES EN EL ENVASADO DE SILICONA

21

inferior el espectro determinado para uno de los picos con tiempo de retención (tR) de 16,691 minutos.

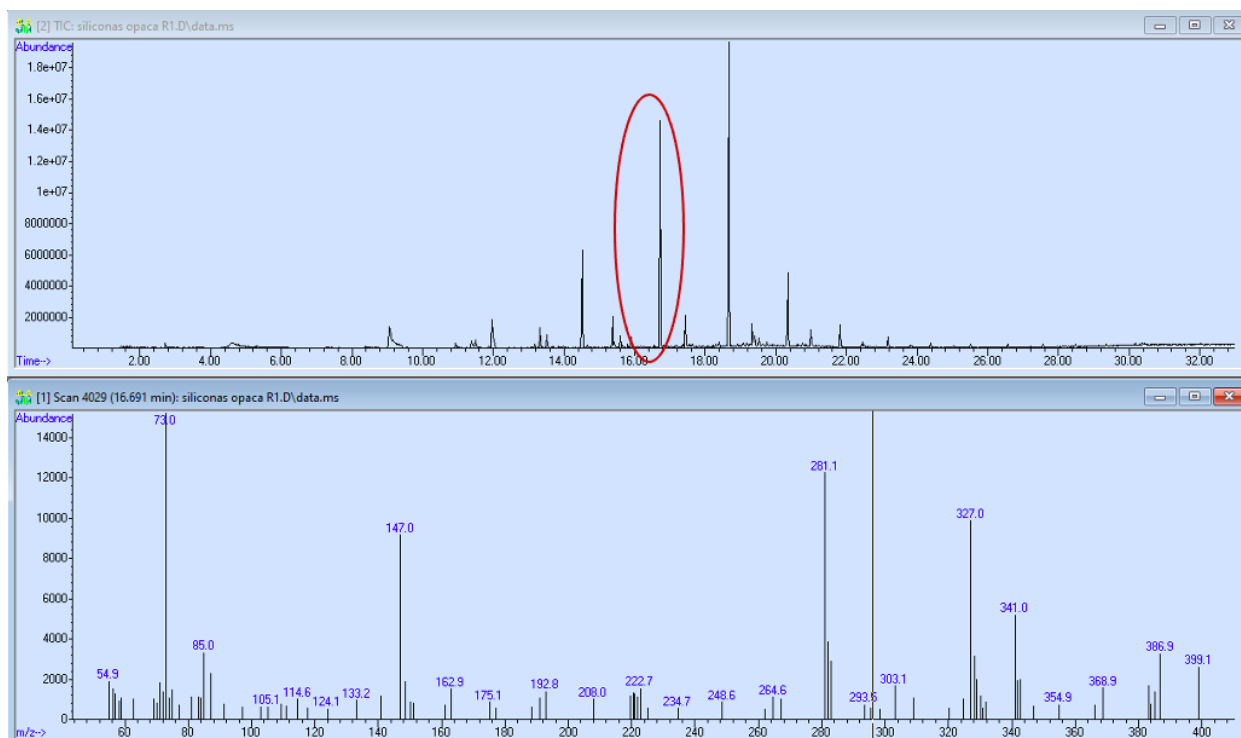


Figura 12: Visualización del espectro de masas generado en la base de datos MSD ChemStation.

En la Figura 13 se identifica dicho compuesto con tR = 16,691 minutos haciendo uso de la librería NIST. El espectro de masas de este compuesto (rojo), coincide en la librería con el espectro generado por el Tetradecametilcicloheptasiloxano (azul). Su identificación se realiza mediante probabilidades, el factor “match”, el cual va de 0 a 1000 siendo aceptable a partir de 750. Al identificar compuestos además podemos saber la formula molecular, la masa exacta, estructura química, número CAS o NIST, esta información aparece en el recuadro inferior derecha.

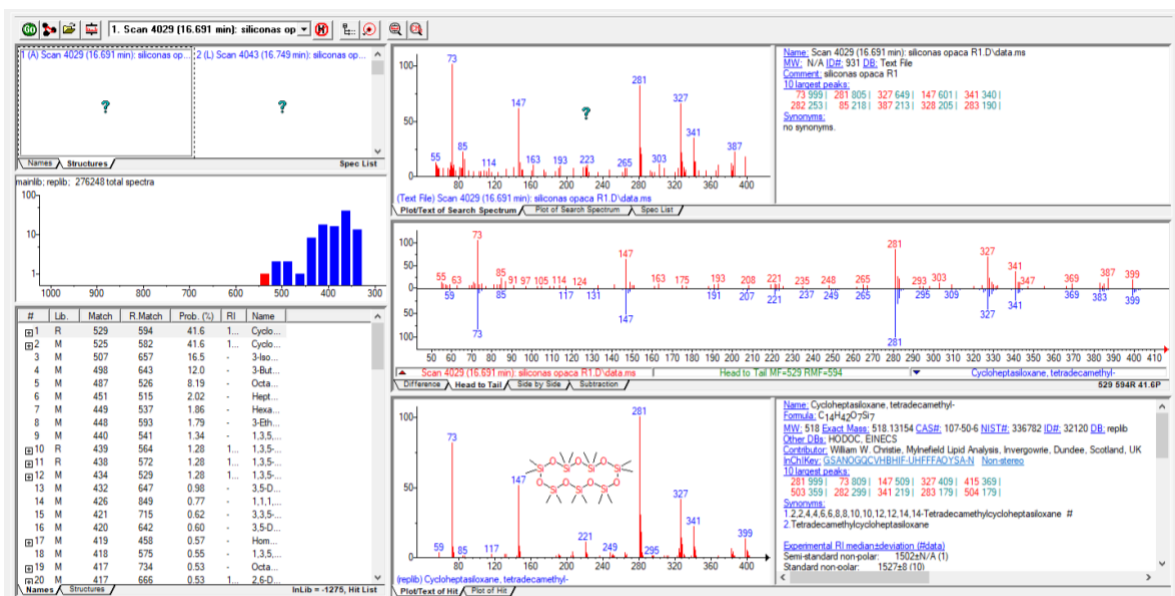


Figura 13: Visualización de la Librería NIST.

Las siguiente Figura 14 muestran una comparativa entre los cromatogramas de las caras opacas y transparentes de la bolsa de silicona.

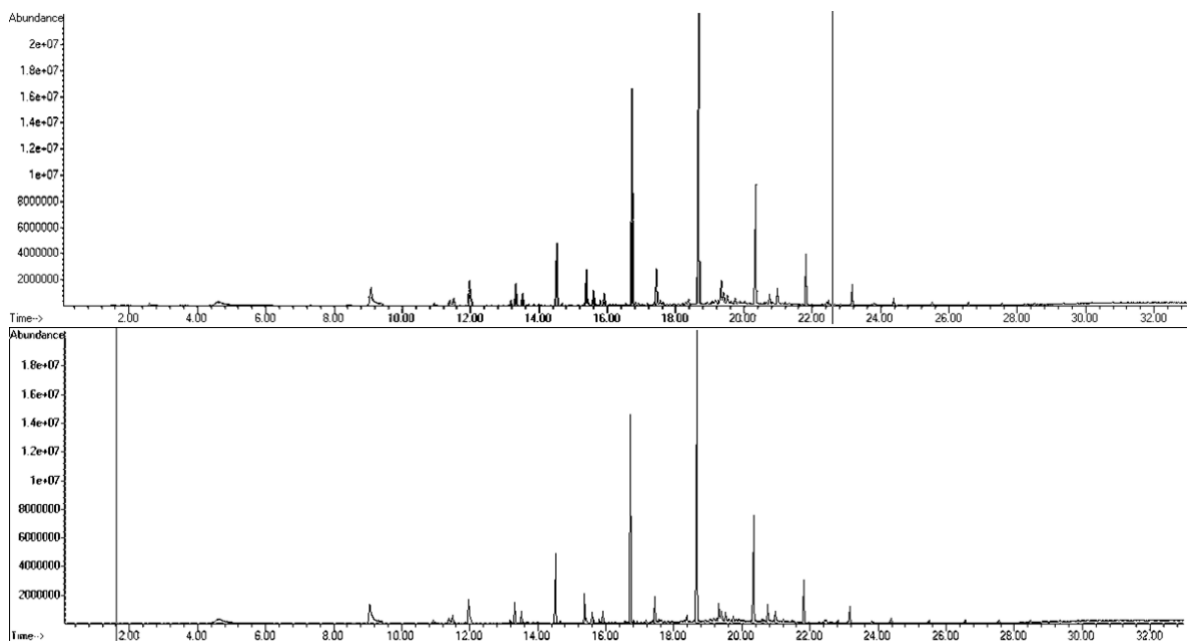
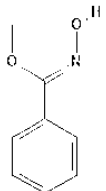
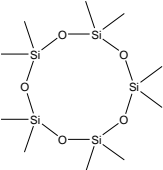
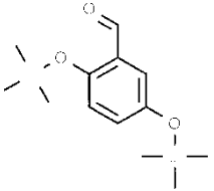
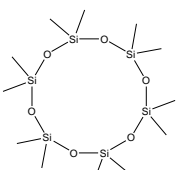
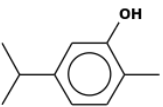
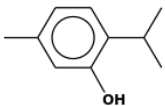
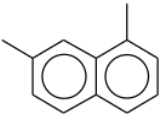
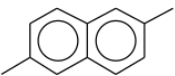
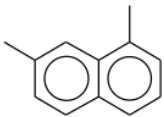
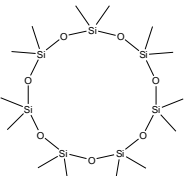
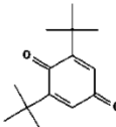
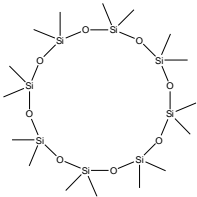
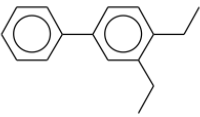
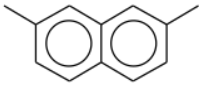


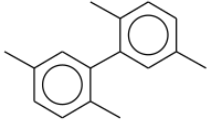


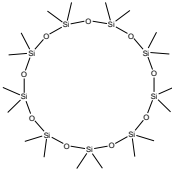
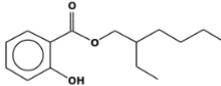
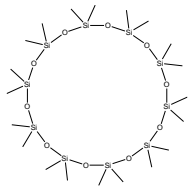
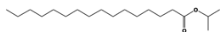
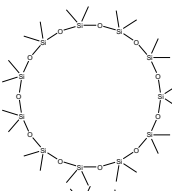
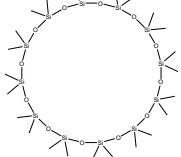
Figura 14: Cromatogramas obtenidos del screening de compuestos, trozos de silicona opacos (recuadro superior) y trozos de silicona transparente (recuadro inferior).

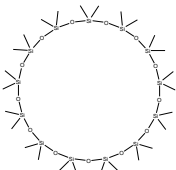
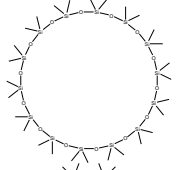
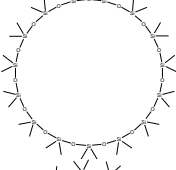
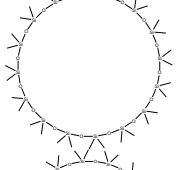
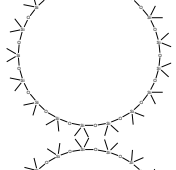
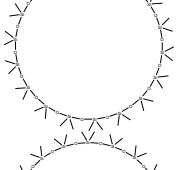
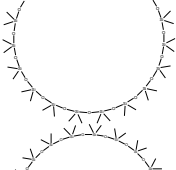
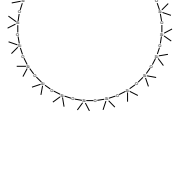
Como se muestra en dichos cromatogramas, tanto la muestra opaca como la transparente, se encuentran los mismos compuestos. En la Tabla siguiente, se muestran los compuestos identificados en las muestras.

Tabla 1: *Compuestos identificados en las bolsas de silicona de uso alimentario.*

tR (min)	Nombre	Estructura	Fórmula	CAS	Masa molecular
7,49	Oxime-, methoxy-phenyl-		$C_8H_9NO_2$	NIST# 222866	151,16
11,9	Decamethylcyclopentasiloxane		$C_{10}H_{30}O_5Si_5$	541-02-6	370,77
11,38	Benzaldehyde, 2,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-		$C_{13}H_{22}O_3Si_2$	56114-69-3	282,11
14,5	Dodecamethylcyclohexasiloxane		$C_{12}H_{36}O_6Si_6$	540-97-6	444,92
14,65	5-Isopropyl-2-methylphenol		$C_{10}H_{14}O$	499-75-2	150,22
14,65	Thymol		$C_{10}H_{14}O$	89-83-8	150,10

16,15	1,5-Dimethylnaphthalene		$C_{12}H_{12}$	571-61-9	156,22
16,16	2,6-Dimethylnaphthalene		$C_{12}H_{12}$	581-42-0	156,22
16,17	1,7-Dimethylnaphthalene		$C_{12}H_{12}$	575-37-1	156,22
16,68	Tetradecamethylcyclotrisiloxane		$C_{14}H_{42}O_7Si_7$	107-50-6	519,08
16,82	2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone		$C_{14}H_{40}O_2$	719-22-2	220,31
18,64	Hexadecamethylcyclotrisiloxane		$C_{16}H_{48}O_8Si_8$	556-68-3	593.23
19,16	3,4'-Diethyl-1,1'-biphenyl		$C_{16}H_{18}$	61141-66-0	210,31
19,17	2,7-Dimethylnaphthalene		$C_{12}H_{12}$	582-16-1	156,22

19,40	2,2',5,5'-Tetramethylbiphenyl		$C_{16}H_{18}$	3075-84-1	210,31
19,84	1,3-Diisopropylnaphthalene		$C_{16}H_{20}$	NIST # 374052	212,33
19,96	1,7-Diisopropylnaphthalene		$C_{16}H_{20}$	NIST # 374061	212,33
20,35	Octadecamethylcyclononasiloxane		$C_{18}H_{54}O_9Si_9$	556-71-8	667,38
20,76	2- Ethylhexyl salicylate		$C_{15}H_{22}O_3$	118-60-5	250,15
21,81	Eicosamethylcyclodecasiloxane		$C_{20}H_{60}O_{10}Si_{10}$	18772-36-6	741.5400
22,82	Isopropyl Palmitate		$C_{19}H_{38}O_2$	142-91-6	298,30
23,16	Docosamethylcycloundecasiloxane		$C_{22}H_{66}O_{11}Si_{11}$	18766-38-6	815,69
24,38	Tetracosamethylcyclododecasiloxane		$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	18919-94-3	889,85

25,57	Hexacosamethylcyclotridecasiloxane		$C_{26}H_{78}O_{13}Si_{13}$	23732-94-7	964,00
26,63	Octacosamethylcyclotetradecasiloxane		$C_{28}H_{84}O_{14}Si_{14}$	149050-40-8	1038,15
27,64	Triacontamethylcyclopentadecasiloxane		$C_{30}H_{90}O_{15}Si_{15}$	23523-14-0	1112,31
28,56	Dotriacontamethylcyclohexadecasiloxane		$C_{32}H_{96}O_{16}Si_{16}$	150026-95-2	1186,46
29,54	Tetratriacontamethylcycloheptadecasiloxane		$C_{34}H_{102}O_{17}Si_{17}$	150026-96-3	1260,62
30,27	Hexatriacontamethylcyclooctadecasiloxane		$C_{36}H_{108}O_{18}Si_{18}$	23523-12-8	1334,77
31,16	Octatriacontamethylcyclononadecasiloxane		$C_{38}H_{114}O_{19}Si_{19}$	150026-97-4	1408,92
32,16	Tetracontamethylcycloicosasiloxane		$C_{40}H_{120}O_{20}Si_{20}$	150026-98-5	1483,08

La mayoría de compuestos que se detectaron, correspondían a oligómeros de la silicona (resaltados en negrita). Se pudo observar que la diferencia de masa entre cada oligómero consecutivo era 74 m/z el cual correspondía a la ganancia del monómero de silicona -SiR₂-O-, del proceso de polimerización. También se observó que dichos compuestos se detectaban equidistantes a una distancia de aproximadamente 1 minuto. Solamente, el

oligómero decametilsiloxano estaba disponible comercialmente, este se analizó y se confirmó que el compuesto a tR de 9,99 minutos correspondía a dicho compuesto.

El material de envasado puede contener sustancias añadidas de forma no intencionada o NIAS (non intentionally added substances) como resultado de las interacciones entre los diferentes ingredientes de los materiales de envasado, procesos de degradación o impurezas presentes en las materias primas utilizadas para su fabricación (EFSA, 2020). Dichos oligómeros pueden clasificarse como sustancias añadidas de forma no intencionada puesto que la liberación de moléculas cíclicas (D5, D6, ...) a temperaturas elevadas indica que se producen posteriores reacciones de polimerización, posiblemente favorecidas por temperaturas elevadas del tratamiento térmico (Tran V., 2019).

Así mismo, fue detectado el compuesto 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone (Mertens B., 2016) que era un compuesto de degradación derivado del BHT, un antioxidante muy comúnmente empleado como aditivo para mejorar las propiedades de los plásticos. Así como el 5-Isopropyl-2-methylphenol o thymol que sirve como conservante ya que tiene propiedades antimicrobianas y proviene de aceites esenciales (Nerín C., 2013).

Compuestos como el 2,7-Dimethylnaphthalene, 1,3-Diisopropylnaphthalene, 1,7-Diisopropylnaphthalene y otros muchos detectados llevan en su estructura compuestos aromáticos policíclicos. Los compuestos con esta estructura son conocidos como disruptores endocrinos, por lo que el consumo de estos puede llegar a tener efectos a largo plazo sobre la salud (Van Cauwenbergh O., 2020).

5.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MIGRANTES DE LA SILICONA

5.2.1. Identificación y cuantificación de compuestos migrantes hacia el Simulante E

Las Figuras 15 y 16 muestran los ensayos de migración en el simulante E de los laminados de silicona transparente y opaca para las dos condiciones 40 °C / 10 días y 175 °C / 2 horas.

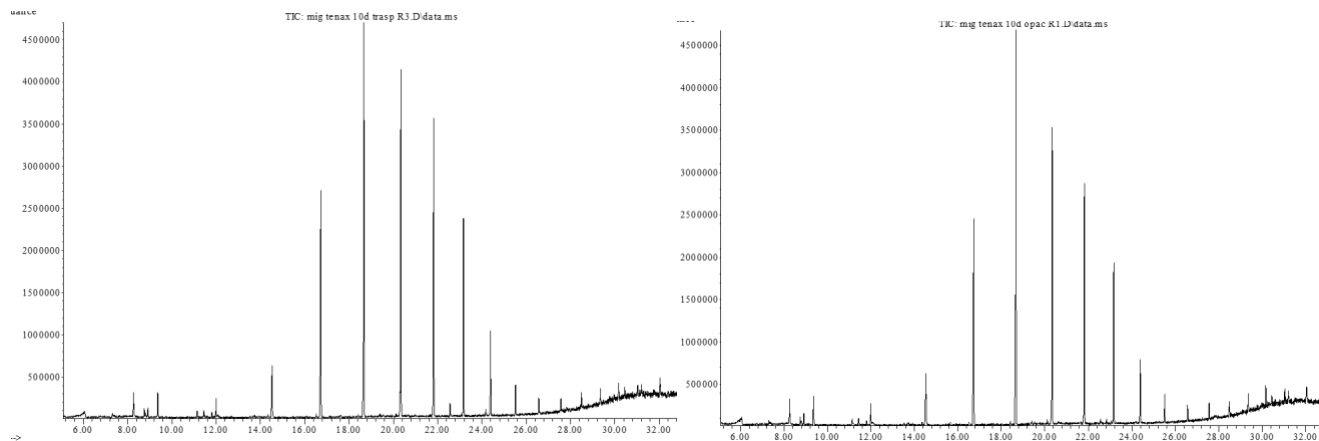


Figura 15: Cromatogramas de migración por inyección directa en GC-MS de laminado transparente y opaco a 40°C/ 10 días al simulante E.

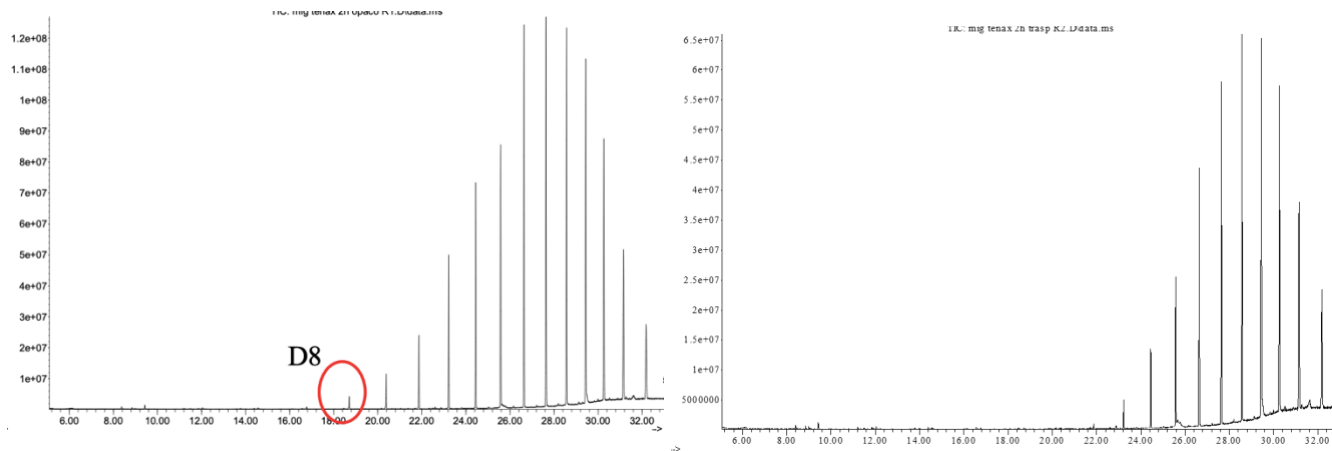


Figura 16: Cromatogramas de migración por inyección directa en GC-MS de laminados opacos y transparentes a 175°C/ 2 horas al simulante E.

Como se observa en los cromatogramas de los compuestos detectados anteriormente en el material, sólo migraban los oligómeros. Por otro lado, en las muestras sometidas a ensayos de migración a 175 °C / 2 horas en el simulante E (Figura 16) no era posible detectar los primeros tres oligómeros, siendo el primero el hexadecamethylciclooctasiloxano o D8 con tR= 18,64 minutos.

Para llevar a cabo la cuantificación de oligómeros detectados, como sólo se disponía comercialmente del patrón decametilciclopentasiloxano, se calcularon las migraciones con dicho

patrón. Se prepararon concentraciones crecientes del patrón en etanol y se analizaron con la misma metodología analítica, inyección directa GC-MS partiendo del patrón de D5 previamente preparado.

Los resultados obtenidos y la pendiente de la recta de calibrado se encuentran representados en la Tabla 2 y en la Figura 17. El rango de respuesta lineal es hasta 10 ppm.

[D5] ppm	Áreas
0,05	319734
0,27	3033655
0,51	2728827
1,06	6706087
2,19	27846946
4,76	52225441
10,27	130558206

Tabla 2. Respuesta del compuesto obtenidas en función de la concentración de decametilciclopentasiloxano.

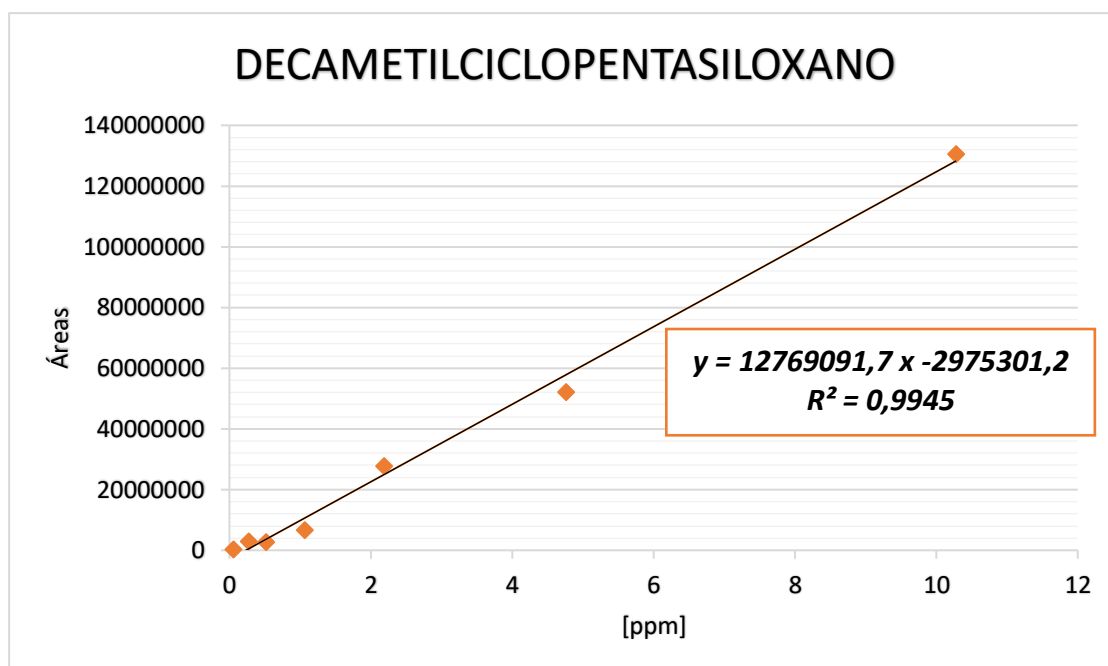


Figura 17: Recta y pendiente de calibrado de Decametilciclopentasiloxano.

Se obtuvo una buena reproducibilidad y un rango lineal comprendido entre 0,05-10 µg/g aproximadamente, con una R^2 de 0,9945.

Para el cálculo de las concentraciones de los compuestos tras la migración, se tomaron las áreas de los compuestos obtenidas y se sustituyeron en las rectas de calibrado. Las concentraciones obtenidas se expresaron como la media de las muestras analizadas por triplicado en µg de compuesto por g de etanol.

Para expresar los resultados en µg totales de cada oligómero de silicona migrado, se tuvo en cuenta el factor de concentración de cada muestra (g de muestra tras concentrar). Por último, se dividieron por las dimensiones del laminado muestra (4 x 2 cm²), de esta forma se expresaron los resultados como µg de compuesto migrado por cm² de envasado de silicona. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, algunos oligómeros no eran detectados en los ensayos a 175 °C, por tanto, su concentración se encontraba por debajo de su LOD.

El límite de detección (LOD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Teóricamente, se debe cumplir que la diferencia entre la altura (h) del pico de la muestra y el blanco sea tres veces la altura del ruido (r). Por lo que para el cálculo del límite de detección se emplea la fórmula:

$$LOD = \frac{3 \cdot hr \cdot C}{hm - hb}$$

Siguiendo dicha fórmula, para determinar las alturas del pico de la muestra, del blanco y del ruido se analizaron 100 ppb del compuesto en etanol por inyección directa con sus respectivos blancos. De esta forma, el límite de detección calculado para la inyección directa GC-MS correspondía a 50 ppb (ng/g) que teniendo en cuenta el factor de dilución y 8 cm² utilizados para el ensayo, su límite de detección serían 0,02 µg /cm². La Tabla siguiente muestran los valores de migración de los oligómeros expresados en µg de compuesto por cm².

Tabla 3. Concentraciones de monómeros de silicona migrados hacia el simulante E a 40 °C / 10 días y 175 °C/2horas.

Abre v.	Nombre	40 °C / 10 días		175°C/2horas	
		Transparentes	Opacas	Transparentes	Opacas
		$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$
D5	Decamethylcyclopentasiloxane	0,17 ± 0,03	0,21 ± 0,02	< 0,02	< 0,02
D6	Dodecamethylcyclohexasiloxane	0,49 ± 0,08	0,57 ± 0,03	< 0,02	< 0,02
D7	Tetradecamethylcycloheptasiloxane	1,62 ± 0,32	1,62 ± 0,06	< 0,02	< 0,02
D8	Hexadecamethylcyclooctasiloxane	2,79 ± 0,41	2,89 ± 0,05	< 0,02	0,45 ± 0,03
D9	Octadecamethylcyclononasiloxane	2,30 ± 0,29	2,22 ± 0,17	< 0,02	0,60 ± 0,15
D10	Eicosamethylcyclodecasiloxane	1,60 ± 0,25	1,77 ± 0,09	1,65 ± 0,38	1,14 ± 0,30
D11	Docosamethylcycloundecasiloxane	1,13 ± 0,23	1,18 ± 0,07	1,98 ± 0,52	2,65 ± 0,85
D12	Tetracosamethylcyclododecasiloxane	0,51 ± 0,11	0,55 ± 0,02	2,24 ± 0,15	2,64 ± 0,48
D13	Hexacosamethylcyclotridecasiloxane	0,24 ± 0,05	0,31 ± 0,01	2,67 ± 0,10	3,10 ± 0,68
D14	Octacosamethylcyclotetradecasiloxane	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,02	3,25 ± 0,05	3,72 ± 1,00
D15	triacontamethylcyclopentadecasiloxane	0,16 ± 0,04	0,23 ± 0,02	3,70 ± 0,16	4,07 ± 0,96
D16	Dotriacontamethylcyclohexadecasiloxane	0,16 ± 0,04	0,24 ± 0,01	3,81 ± 0,05	4,00 ± 0,91
D17	Tetratriacontamethylcycloheptadecasiloxane	0,18 ± 0,03	0,25 ± 0,01	3,67 ± 0,08	3,62 ± 0,57
D18	Hexatriacontamethylcyclooctadecasiloxane	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,02	3,31 ± 0,14	3,14 ± 0,37
D19	Octatriacontamethylcyclononadecasiloxane	0,21 ± 0,02	0,25 ± 0,02	2,64 ± 0,26	3,36 ± 0,64
D20	Tetracontamethylcycloicosasiloxane	0,25 ± 0,06	0,33 ± 0,06	3,05 ± 0,84	4,11 ± 0,82

La migración de compuestos químicos es como prácticamente todos los procesos físicos y químicos, aumenta con el incremento de temperatura (Barnes K. et al., 2007). Por lo que al aumentar la temperatura la concentración de compuesto migrado es mayor si comparamos con los resultados obtenidos a 40 °C / 10 días. Esta tendencia se observa para los oligómeros de mayor peso molecular, es decir, los últimos a partir de D10. Sin embargo, para los oligómeros de menor

peso molecular, su concentración es mayor para 40 °C, esto puede ser debido a que a altas temperaturas se evaporen y por tanto no sean retenidos por el Tenax.

5.2.2. Identificación y cuantificación de compuestos migrantes en el Simulante B

En la Figura 18, se muestran los cromatogramas tras la migración a acético al 3% a 40 °C / 10 días como condiciones de ensayo de la cara transparente de las bolsas de silicona y el blanco.

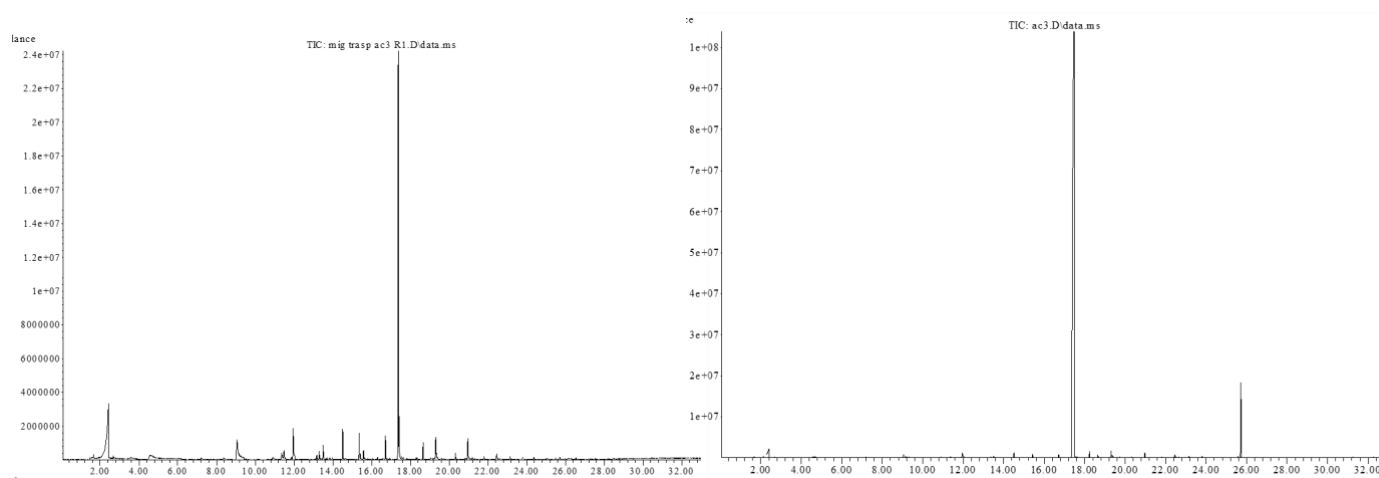


Figura 18: Cromatogramas tras la migración a acético al 3% de la cara transparente (derecha) analizados por HS-SPME-GC-MS a 40 °C / 10 días y el blanco (izquierda).

No se detectaba ningún compuesto para la migración a acético al 3% para ambas condiciones comparando en el blanco.

Por tanto, sus valores de migración se encontraban por debajo sus LOD. En el caso de acético al 3% analizado por HS-SPME-GC-MS, correspondía a 0,5 ng/g. Al comparar los resultados obtenidos de límite de detección, cabe destacar, que el método de HS-SPME es unas 100 veces más sensible para este compuesto que la inyección directa.

5.3. ANALISIS DE RIESGO

Las siliconas, como cualquier otro material en contacto con alimentos deben cumplir con Reglamento marco (CE) n° 1935/2004. A pesar de esto, El Reglamento (CE) n° 10/2011 sobre los materiales en contacto con alimentos no es aplicable a resinas de intercambio iónico, caucho ni siliconas. Por lo que los oligómeros que migraban en el Tenax, no están incluidos en la lista positiva de este Reglamento. (Liu Y., 2021). Por tanto, sus valores de migración debían de compararse con la máxima ingesta recomendada por Cramer.

De esta forma, la toxicidad se evaluó a partir de las Reglas de Cramer con el software Toxtree v1.51 (Ideconsult Ltd.). Al evaluar los oligómeros con el árbol de decisión, son clasificados con una toxicidad III, por lo que los límites establecidos según las Reglas de Cramer se sitúan en 0,09 mg/Kg.

Para determinar si la concentración calculada de los oligómeros migrantes de la silicona al Tenax excedían dicho límite, se calculaban los valores de migración en $\mu\text{g/g}$ simulante, teniendo en cuenta según la legislación RD 10/2011, que en 6 dm^2 de envase caben 1Kg de simulante. Como se ha mencionado anteriormente en el apartado 5.2.1., el límite de detección calculado para la inyección directa GC-MS correspondía a $0,02\text{ }\mu\text{g /cm}^2$ lo que corresponde a $0,01\text{ }\mu\text{g /g}$ de simulante.

La Tabla siguiente se muestran los valores de migración expresados en μg de compuesto por gramo de simulante.

Tabla 4. Concentraciones de monómeros de silicona migrados hacia el simulante E a 40 °C / 10 días y 175 °C/2horas.

Abrev.	Nombre	40 °C / 10 días		175°C/2horas	
		Transparentes	Opacas	Transparentes	Opacas
		$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
D5	Decamethylcyclopentasiloxane	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,01	< 0,01	< 0,01
D6	Dodecamethylcyclohexasiloxane	0,29 ± 0,05	0,34 ± 0,02	< 0,01	< 0,01
D7	Tetradecamethylcycloheptasiloxane	0,97 ± 0,19	0,97 ± 0,04	< 0,01	< 0,01
D8	Hexadecamethylcyclooctasiloxane	1,68 ± 0,25	1,73 ± 0,03	< 0,01	0,27 ± 0,02
D9	Octadecamethylcyclononasiloxane	1,38 ± 0,17	1,33 ± 0,10	< 0,01	0,36 ± 0,09
D10	Eicosamethylcyclodecasiloxane	0,96 ± 0,15	1,06 ± 0,05	0,99 ± 0,23	0,69 ± 0,18
D11	Docosamethylcycloundecasiloxane	0,68 ± 0,14	0,71 ± 0,04	1,19 ± 0,31	1,59 ± 0,51
D12	Tetracosamethylcyclododecasiloxane	0,31 ± 0,07	0,33 ± 0,01	1,35 ± 0,09	1,58 ± 0,29
D13	Hexacosamethylcyclotridecasiloxane	0,15 ± 0,03	0,18 ± 0,01	1,60 ± 0,06	1,86 ± 0,41
D14	Octacosamethylcyclotetradecasiloxane	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,01	1,95 ± 0,03	2,23 ± 0,60
D15	Triacontanethylcyclopentadecasiloxane	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01	2,22 ± 0,10	2,44 ± 0,58
D16	Dotriacontanethylcyclohexadecasiloxane	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01	2,29 ± 0,03	2,40 ± 0,55
D17	Tetratriacontamethylcycloheptadecasiloxane	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,00	2,20 ± 0,05	2,17 ± 0,34
D18	Hexatriacontamethylcyclooctadecasiloxane	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,01	1,99 ± 0,08	1,88 ± 0,22
D19	Octatriacontamethylcyclononadecasiloxane	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,58 ± 0,16	2,01 ± 0,38
D20	Tetracontamethylcycloicosasiloxane	0,15 ± 0,04	0,20 ± 0,03	1,83 ± 0,50	2,47 ± 0,49

Al comparar los valores de migración con la ingesta máxima recomendada para estos compuestos, se observa que en el caso del Tenax ® los resultados excedían los 0,09 mg/Kg establecidos como límite en todos los oligómeros cuantificados.

En el caso del simulante acético al 3%, los compuestos se encontraban por debajo de su límite de detección que correspondía a 0,5 ng/g, por lo tanto, estaban muy por debajo de los 0,09mg de compuesto migrado por Kg de simulante como el límite establecido según su toxicidad.

6. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo realizado se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se ha realizado un análisis cualitativo por HS-SPME-GC-MS de los trozos de silicona transparentes y opacos, donde se identificaron un gran número de compuestos, como oligómeros y compuestos de degradación. Demostrando que las siliconas son mezclas muy complejas en las que se pueden encontrar compuestos con diferente naturaleza química, lo que hace muy relevante su estudio y evaluación de su migración.
2. Se ha realizado los estudios de migración de los compuestos volátiles desde laminados transparentes y opacos de silicona empleando dos simulantes alimentarios; Tenax[®] y Ácido acético 3%. Para el análisis del Tenax se ha utilizado un método de inyección directa y para el análisis del ácido acético al 3% un método de HS-SPME-GC-MS
3. En la migración al Tenax[®] se han identificado una gran cantidad de oligómeros migrantes, y la tendencia a migrar aumentaba para los de mayor peso molecular al cambiar las condiciones de migración a una temperatura, 175 °C.
4. Para la migración al Tenax[®], en ambas condiciones, los oligómeros migraban por encima de los valores recomendados por Cramer según su toxicidad la cual era grado III.
5. Los resultados de migración para el acético al 3%, mostraban que ningún compuesto migraba al comparar con su blanco. Los oligómeros se encontraban por debajo de su límite de detección y, por tanto, muy por debajo del valor recomendado por Cramer.

CONCLUSIONS

The following conclusions have been drawn from the present work:

1. A qualitative analysis by HS-SPME-GC-MS of transparent and opaque silicone pieces has been carried out, where a large number of compounds were identified, such as oligomers and degradation compounds. This shows that silicones are very complex mixtures in which compounds of different chemical nature can be found, which makes their study and evaluation of their migration very relevant.
2. Migration studies of volatile compounds from transparent and opaque silicone laminates have been carried out using two food simulants; Tenax[®] and 3% acetic acid.

3. In migration to Tenax[®] a large number of migrating oligomers have been identified, and the tendency to migrate increased for those of higher molecular weight when changing the migration conditions at one temperature, 175 °C.
4. For migration to Tenax[®], in both conditions, the oligomers migrated above Cramer's recommended values for toxicity, which was grade III.
5. Migration results for 3% acetic showed that no compound migrated when compared to its target. The oligomers were below their detection limit and therefore well below Cramer's recommended value.

7. VALORACIÓN DE LA ASIGNATURA

El desarrollo del Trabajo de Fin de Grado ha servido para aumentar mis conocimientos sobre el envasado de alimentos y su importancia en el control de alimentos, el esfuerzo que amerita la realización de los ensayos pertinentes pautados por la normativa europea destaca lo minuciosa que es cada una de las precauciones que se toman con el objetivo de asegurar la inocuidad de los alimentos. Me ha parecido una experiencia muy enriquecedora para mi formación, me ha permitido adquirir mayor autonomía en el laboratorio y aprender la forma en la que se trabaja allí. Además, realizar el Trabajo de Fin de Grado en el área de Química Analítica me ha permitido revisar y refrescar muchos de los conceptos que se estudian en los primeros cursos del Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos.

El proceso de elaboración de la memoria me ha aportado mayor destreza para buscar información bibliográfica relevante, me ha enseñado a autogestionar el tiempo y la manera de hacer un trabajo propio. También me ha ayudado a aprender a sintetizar mejor los datos recogidos durante la investigación y expresarlos de forma clara. En definitiva, valoro muy positivamente todo el proceso de elaboración del Trabajo de Fin de Grado debido a la experiencia, soltura y los conocimientos que aporta.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, M., Ullah, R. y Alam, S. (2019). “Aging of silicone rubber-based composite insulators under multi-stressed conditions: an overview”. *Materials Research Express*; 6(10). DOI: <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab3f0d>
- Alamri, M.S., Qasem, A., Mohamed, A., Hussain, S., Ibraheem, M., Shamlan, G., Alqah, H. y Qasha, A. (2021). “Food packaging’s materials: A food safety perspective”. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28(6) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.047>
- Aysel, İ. y Bülent, E. (2016). “Selection of food packaging material, migration and its effects on food quality”. *Quality of Life*.
- Bannister, D.J. y Semlyen, J.A., (1981). “Studies of cyclic and linear poly (dimethyl siloxanes): 6. Effect of heat” *Polymer*, 22(3), pp 377-381. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(81\)90050-1](https://doi.org/10.1016/0032-3861(81)90050-1)
- Bradley, E. y Castle, L. (2007). “Chemical migration and food contact materials”. *CRC Press*, pp 1-13.
- Brennan, L., Langley, S., Verghese, K., Lockrey, S., Ryder, M., Francis, C., Tram Phan-Le, N. y Hill, A. (2021). “The role of packaging in fighting food waste: A systematised review of consumer perceptions of packaging”. *Journal of Cleaner Production*, 281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125276>.
- Camino, G., Lomakin, S.M. y Lageard, M. (2002). “Thermal polydimethylsiloxane degradation. Part 2. The degradation mechanisms”. *Polymer*, 43(7), pp 2011-2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00785-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00785-6).
- CEN UNE-EN 14338 (2004). “Condiciones para la determinación de la migración desde el papel y cartón utilizando óxido de polifenileno modificado (MPPO) como simulante”
- European Food Safety Authority *CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids)*, Silano V., Barat J., Bolognesi C., Chesson A., Cocconcelli P., Crebelli R., Gott, D., Grob K., Lambré C., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Steffensen I., Tlustos C., Van Loveren, H., Vernis L., Zorn H., Benfenati E., Castle L., Di Consiglio E., Franz R., Hellwig N., Milana M., Pfaff K., Civitella C., Lioupis A., Pizzo F., Rivière G. (2020), “Review and priority setting for substances that are listed without a specific migration limit in table 1 of annex 1 of regulation 10/2011 on plastic materials and

- articles intended to come into contact with food” *EFSA Journal* 18(6), pp 104. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6124>
- González, J. (2010). “14 – Cromatografía”. *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*, pp 197-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2029-2.50014-8>.
 - Gutiérrez Bouzán, M., Burdó Expósito, A. y Cegarra Sánchez, J. (2009). “La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC” *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 135, pp 33-40.
 - Liu Y., Wrona M., Su Q., Vera P., Nerín C. y Hu C. (2021). “Influence of cooking conditions on the migration of silicone oligomers from silicone rubber baking molds to food simulants”. *Food Chemistry*, 347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128964>.
 - Mertens, B., Hoeck, E., Blaude, M., Simon, C., Onghena, M., Vandermarken, T., Langenhove, K., Demaegdt, H., Vandermeiren, K., Covaci, A., Scippo, M., Elskens, M. y Loco, J. (2016). “Evaluation of the potential health risks of substances migrating from polycarbonate replacement baby bottles” *Food and Chemical Toxicology*, 97, pp 108-119. DOI: [10.1016/j.fct.2016.08.019](https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.019)
 - Nerin, C., Alfaro, P., Aznar, M. y Domeño, C. (2013). “The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review” *Analytica Chimica Acta*, 775, pp 14–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.028>.
 - Reglamento (CE) n^o 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 12/1 de 11 de enero de 2011.
 - Reglamento (CE) n^o 2023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 384/75 de 29 de diciembre de 2006.
 - Reglamento (CE) n^o 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338/4 de 13 de noviembre de 2004.
 - Stashenko, E. y Martínez, J. (2010). “GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?” *Scientia Chromatographica*, 2(4), pp 25-48.

- Tran, V., Gélin, P., Ferronato, C., Chovelon, J., Fine, L. y Postole, G. (2019). “Adsorption of linear and cyclic siloxanes on activated carbons for biogas purification: Sorbents regenerability”. *Chemical Engineering Journal*, 378. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122152>.
- Van Cauwenbergh, O., Di Serafino, A., Tytgat, J. y Soubry, A. (2020). “Transgenerational epigenetic effects from male exposure to endocrine-disrupting compounds: a systematic review on research in mammals” *CLINICAL EPIGENETICS*, 12(1):65 DOI: 10.1186/s13148-020-00845-1
- Wrona, M y Nerín, C. (2020) “Analytical Approaches for Analysis of Safety of Modern Food Packaging: A Review” *Molecules*, 25(3):752. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25030752>